

## 目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
准备工作	4
方案 1:土壤 RNA 小量抽提	5
方案 2:土壤 RNA 中量抽提	5
常见问题回答	8

版本: 2018-01

## 简介

HiPure Soil RNA Kits 适合于从土壤样品中提取高纯度微生物总 RNA。试剂盒采用硅胶柱纯化技术，并结合独创的腐殖酸吸附剂技术，适合于从各种土壤，如森林土壤，草地土壤，矿区土壤，底泥等样品中提取高产量高纯度的总 RNA。得到的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern blot、poly-A+纯化、核酸保护和体外翻译等实验。

	Soil RNA Mini Kit	Soil RNA Midi Kit
产品编号	R4183	R4184
土壤处理量	0.5g	3g
结合力	20 µg	500 µg
洗脱体积	15-50 µl	100-200 µl
柱子类型	小柱(1.5ml)	中量(15ml)

## 原理

HiPure 硅胶柱以高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电等物理化学作用吸附核酸，而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除残留的蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。

HiPure Soil RNA Kit 适合于从土壤样品中提取微生物总 RNA。生物膜经裂解液和珠磨法匀浆裂解微生物。RNA 释放到裂解液中。加入氯仿抽提去除蛋白质，转移上清液并用乙醇调节结合条件，混合液转移至柱子中过滤，RNA 被吸附在柱子的膜上，而杂质不被吸附而去除。柱子经 Buffer RW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后用 RNase Free Water 洗脱出 RNA。得到的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern blot、poly-A+纯化、核酸保护和体外翻译等实验。

## 保质期

HiPure Soil RNA Kit 组分可在室温下(15-25°C)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8°C。因 RNase Free Water 中不含任何抑菌因子，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。我们推荐分装 RNase Free Water 并保存于-20°C，以减少污染。

## 组成

### HiPure Soil RNA Mini Kit

产品编号	R4183-01	R4183-02	R4183-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
gDNA Filter Column	10	50	250
2ml Beads Tubes	10	50	250
Buffer SOL	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer SDS	1 ml	4 ml	15 ml
Buffer PHC	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer GDP	10 ml	40 ml	150 ml
Buffer RBL	10 ml	50 ml	200 ml
Buffer RWC*	10 ml	50 ml	2x125 ml
Buffer RW2 *	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml

### HiPure Soil RNA Midi Kit

产品编号	R4184-01	R4184-02	R4184-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Column	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
gDNA Filter Midi Column I	10	50	250
1.5ml Collection Tubes	10	50	250
1.5ml Beads Tubes	10	50	250
Buffer SOL	30 ml	150 ml	2 x 350 ml
Buffer SDS	3 ml	20 ml	70 ml
Buffer PHC	30 ml	150 ml	2 x 350 ml
Buffer GDP	30 ml	200 ml	2 x 350 ml
Buffer RBL	60 ml	250 ml	3 x 400 ml
Buffer RWC*	40 ml	200 ml	2 x 400 ml
Buffer RW2 *	20 ml	2 x 100 ml	4 x 100 ml
RNase Free Water	10 ml	50 ml	250 ml
说明书	1	1	1

## 方案 1. 土壤样品总 RNA 小量提取

该方案适合于从 500mg 土壤样品中提取高纯度的总 RNA。

### 需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
  - 氯仿
  - 水饱和酚
  - 用无水乙醇稀释 Buffer RW2, 并于室温保存
  - 用无水乙醇稀释 Buffer RVC, 并于室温保存
1. 称取 500mg 土壤样品至 2ml Bead Tubes 中, **加入 500 $\mu$ l Buffer SOL、50 $\mu$ l Buffer SDS 和 500 $\mu$ l Buffer PHC 至样品中**, 在涡旋仪上最高速度涡旋混匀 10 分钟。  
这一步最好用珠磨仪(Fastprep-24)来匀浆样品。匀浆时间和速度参照仪器的说明书。
  2. 短暂离心。**加入 200 $\mu$ l 氯仿至裂解液中**。剧烈涡旋混匀 15 秒, 静置 5 分钟。
  3. 室温下, 12,000  $\times$  g 离心 5 分钟。
  4. 小心转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。**加入等倍体积的 Buffer GDP 至上清液中**。涡旋混匀 20 秒。
  5. 取一个 gDNA Filter Column 装在 2ml 收集管中。把混合液转移至 gDNA 过滤柱子中。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
  6. 弃去 gDNA 过滤柱。**加入等倍体积 Buffer RBL 至滤液中**。吸打混匀 5-10 次。
  7. 把 HiPure RNA Mini Columns I 装在 2ml 收集管中。**转移一半体积的混合液至柱子中**。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
  8. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。转移剩余的混合液至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
  9. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 500 $\mu$ l Buffer RVC 至柱子上**。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。  
Buffer RVC 在使用之前, 必须按说明书或瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
  10. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 600 $\mu$ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中**。

10,000 × g 离心 30-60 秒。

Buffer RW2 在使用之前，必须按说明书或瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。

11. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 600µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**  
10,000 × g 离心 30-60 秒。
12. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。10,000 × g 离心空柱 3 分钟甩干柱子的基质。
13. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。**加入 15-50µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。**  
室温静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。  
HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是 15µl，小于 15µl 会导致 RNA 的洗脱效率下降。若 RNA 产量超过 10µg，推荐按第 16 步进行第二次洗脱以获得更高产量。
14. 丢弃 RNA 柱子，把 RNA 样品保存-80°C。

## 方案 2. 土壤样品总 RNA 中量提取

该方案适合于从 3g 土壤样品中提取总 RNA。

### 需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 氯仿
- 水饱和酚
- 用无水乙醇稀释 Buffer RW2, 并于室温保存
- 用无水乙醇稀释 Buffer RWVC, 并于室温保存

1. 转移 3g 土壤样品至 15ml Bead Tubes 中, **加入 2.5ml Buffer SOL、250 $\mu$ l Buffer SDS 和 2.5ml Buffer PHC 至土壤样品中**。在涡旋仪上最高速度涡旋混匀 10 分钟。  
这一步最好用珠磨仪(Fastprep-24 或 Tissue Lyser)来匀浆样品。匀浆时间和速度参照仪器的说明书。
2. **加入 1ml 氯仿至裂解液中**。剧烈涡旋混匀 15 秒, 静置 5 分钟。
3. 室温下, 3,000-4,000 x g 离心 15 分钟。
4. 小心转移上清液至新的 15ml 离心管中。**加入等体积的 Buffer GDP 和无水乙醇至上清液中**。涡旋混匀 15 秒。
5. 取一个 gDNA Filter Midi Column I 装在 15ml 收集管中。把一半体积的混合液转移至 gDNA 过滤柱子中。室温下, 3,000-4,000 x g 离心 3 分钟。
6. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子中。室温下, 3,000-4,000 x g 离心 3 分钟。
7. 加入 0.5ml Buffer GDP 于柱子中, 静置 2 分钟。室温下, 3,000-4,000 x g 离心 3 分钟。弃去 gDNA 过滤柱。
8. **加入 0.5 倍体积无水乙醇至滤液中**, 涡旋混匀 15 秒。
9. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。**转移混合液至柱子中**。室温下,

10,000 × g 离心 1 分钟。

10. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 0.6ml Buffer RW1 至柱子上。**室温下，10,000 × g 离心 1 分钟。

Buffer RW1 在使用之前，必须按说明书或瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。

11. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 0.5ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**室温下，10,000 × g 离心 1 分钟。

Buffer RW2 在使用之前，必须按说明书或瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。

12. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 0.5ml Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**室温下，10,000 × g 离心 1 分钟。

13. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。室温下，10,000 × g 离心 1 分钟甩干柱子的基质。

14. 将柱子转移至新的 15ml 离心管中。**加入 30-100µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温静置 2 分钟。室温下，3,000-4,000 × g 离心 3 分钟。

15. 丢弃 RNA 柱子，把 RNA 样品保存-80°C。

## 常见问题回答

该列表可能有利于解决您在提取过程中所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供咨询服务，若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，都请您联系我们，我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
<b>RNA 产量低</b>	
土壤裂解不充分	建议采用高能量的珠磨仪进行研磨。使用普通涡旋仪时，要把速度调到最大，以达到充分涡旋的目的。
样品起始用量太多	土壤样品太多，样品没有达到充分涡旋或混匀的目的。
土壤样品 RNA 含量低	不同的土壤 RNA 含量较异非常大
RNA 的洗脱效率低	RNase Free Water 没有加到膜上，或洗脱体积不够。增加洗脱液的体积
Buffer RW2 没有加入乙醇稀释	使用前，Buffer RW2 必须加入无水乙醇进行稀释
<b>RNA 降解</b>	
样品用量太多	减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的必要条件。
RNA 酶污染	操作过程引入 RNA 酶的污染。
<b>DNA 污染</b>	
没有进行 DNase I 消化	不要省略 DNASE I 膜上消化步骤，确保 DNase I 消化液全部加到膜中央。
氯仿抽提振荡不够	加入氯仿后，盖紧盖子。然后用手剧烈上下振荡 15 秒。不要用涡旋或颠倒混匀。
<b>下游实验结果不理想</b>	
盐分污染	加入 Buffer RW2 后，静置 5 分钟后，再离心。
乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于 10,000xg，离心时间为 2 分钟。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，可能过 12,000xg 离心 2 分钟去除。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。